

# **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO/ANTIMUTAGÊNICO, ANTIINFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS DE PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE**

RACHEL **BERTOLDO**<sup>1</sup>; MARIA TERESA B. **PACHECO**<sup>2</sup>; APARECIDA S. **SOUZA**<sup>2</sup>,  
VERA S. N. DA **SILVA**<sup>2</sup>; LUCIANO B.C. da **SILVA**<sup>3</sup>; ROSELI **SONCINI**<sup>3</sup>.

Nº 10226

## **RESUMO**

O soro do leite é uma solução líquida que permanece após precipitação e remoção da caseína durante o processamento do queijo. Ele é rico em nutrientes e não tem sido adequadamente aproveitado. Algumas das substâncias presentes nos alimentos podem apresentar atividade biológica benéfica ao organismo, tais como atenuar ou anular efeitos mutagênicos e/ou carcinogênicos, apresentar efeito antiinflamatório e/ou analgésico. O objetivo deste trabalho foi produzir e caracterizar um hidrolisado de proteínas de soro de leite com a enzima alcalase, para avaliar o potencial mutagênico/antimutagênico e as propriedades analgésicas e antiinflamatórias, em ensaios com animais. A avaliação do efeito do hidrolisado *in vivo* foi realizada através de três testes: micronúcleo, contorções abdominais induzido pela injeção intraperitoneal de ácido acético e edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina, em camundongos albinos Swiss. Para o teste do micronúcleo as dietas foram preparadas segundo a AIN-93G, com concentração de 12% de proteína, oriunda do concentrado de soro de leite, do hidrolisado, comparada a caseína. Os resultados mostraram que as dietas não apresentaram caráter mutagênico, antimutagênico e nem protetor. No teste de contorções abdominais a administração do hidrolisado por meio de gavagem na dose de 300mg/Kg apresentou resultado semelhante ao da indometacina (controle positivo) na dose de 10mg/Kg, ou seja, demonstrou efeito analgésico. Já no teste de edema de pata a administração nas doses de 30mg/kg, 100mg/kg e 300mg/kg e da indometacina, quando comparados aos valores do controle apresentaram efeito antiinflamatório.

**Palavras chaves:** hidrolisados protéicos, proteínas de soro de leite, efeito mutagênico, efeito antiinflamatório, efeito analgésico.

---

1. Bolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, UNIFAL, Alfenas - MG, ✉  
rachelbertoldo@yahoo.com.br

2. Orientador: Pesquisador, Maria Teresa Bertoldo Pacheco/ ITAL, Campinas-SP.

3. Departamento de Ciências Biomédicas, UNIFAL- MG.

## **ABSTRACT**

The whey is a liquid solution remaining after precipitation and removal of casein during cheese processing. It is rich in nutrients and has not been properly tapped. Some of the substances present in foods may have biological activity beneficial to the body, such as to mitigate or reverse mutagenic effects and / or carcinogens, produce anti-inflammatory and / or analgesic effect. The objective of this work was to produce and characterize a hydrolyzed whey protein with Alcalase enzyme, to assess the potential mutagenic / antimutagenic and anti-inflammatory and analgesic properties in animal tests. The evaluation of the effect of hydrolyzed in vivo was accomplished through three tests: micronucleus, abdominal contortions induced by intraperitoneal injection of acetic acid and paw edema induced by intraplantar injection of carrageenan in Swiss albino mice. For the micronucleus test diets were prepared according to AIN-93G, with a concentration of 12% protein, derived from concentrated whey, hydrolyzed, compared to casein. The results showed that the diets did not show character mutagenic, antimutagenic and not protective. In the abdominal contortion test administration hydrolyzed by gavage at a dose of 300 mg / kg showed a similar result to that of indomethacin (positive control) at a dose of 10mg/kg, or demonstrated analgesic effect. In the paw edema test administration at doses of 30mg/kg, 100mg/kg and 300mg/kg and indomethacin, when compared to the control values showed anti-inflammatory effect.

## **INTRODUÇÃO**

De acordo com estimativas mais recentes são produzidos mundialmente, cerca de 286 milhões de toneladas de soro de leite por dia (TORRES, 2005). Deste total 30% é destinado a fabricação de queijo, sendo o soro, a solução líquida que permanece após precipitação e remoção da caseína durante o processamento do queijo. O soro é rico em nutrientes, e seu principal destino tem sido o meio ambiente e o esgoto (HOSSEINI *et al.*, 2003). Atualmente, o soro é visto como um co-produto que pode agregar valor a produção de derivados do leite, não só por ser fonte de proteínas de alto valor nutricional com excelente balanço de aminoácidos, mas pelas características de alimento funcional que lhe tem sido atribuído (SGARBIERI e PACHECO, 1999).

A hidrólise enzimática de polímeros em alimentos, como por exemplo, de proteínas, é um processo de considerável importância que tem sido utilizado para expressar propriedades bioativas, melhorar propriedades físicas, químicas e funcionais dos alimentos, sem prejudicar seu valor nutritivo, melhorando, particularmente, as características de absorção, alergenicidade e digestibilidade das proteínas (GONZÁLES *et al.*, 1994).

De acordo com Winter, Risley e Nuss (1962) diversos componentes alimentícios tem sido utilizados em pesquisas de novas drogas com potencial antimutagênico, analgésica e anti-inflamatória. Os agentes flogísticos, indutores do processo inflamatório, como carragenina, dextrana e histamina são bastante usados em triagem farmacológica para avaliação de substâncias com potencial anti-inflamatório.

O objetivo deste trabalho foi produzir e caracterizar hidrolisados de proteínas de soro de leite com a enzima alcalase, avaliar as propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e o potencial mutagênico/antimutagênico, utilizando como indicador, eritrócitos policromáticos da medula óssea de camundongos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Matéria prima: concentrado protéico (CPS) fornecido pela empresa Arla Foods Ingredients (Lacprodan). Para obtenção do hidrolisado protéico (HPS) foi utilizada a protease alcalase 6L (*Bacillus licheniformis*, da Novo Nordisk), nas condições de: pH 8,0, temperatura 60°C, concentração do substrato 10% e concentração da enzima 1%. A composição centesimal de sólidos totais, proteína bruta (Nx6,38), cinzas e lipídeos foram determinadas segundo AOAC (2005).

### Teste do Micronúcleo

Para avaliar a atividade mutagênica/antimutagênica do hidrolisado, foram utilizados camundongos divididos nos grupos tratados 1 (controle positivo) e 2 (controle negativo). Os animais receberam dieta contendo como fonte protéica (12%) a caseína, grupos 3 e 4 receberam dietas contendo 12% de hidrolisados protéicos, grupos 5 e 6 receberam dietas contendo 12% de concentrado protéico do soro. No 15º dia do experimento, 24 horas antes da eutanásia, os animais dos grupos 1, 3, 5 e 2, 4, 6 receberam dose única da substância mutagênica, a CPA 50 mg/kg pc, e de NaCl 0,9% respectivamente. O material da medula óssea foi coletado e foram preparadas lâminas (esfregaços) dos cada animal. A análise das lâminas foi realizada sob teste cego (WINTER, RISLEY E NUSS, 1962).

Teste de Contorções Abdominais: Foram utilizados camundongos fêmeas divididas nos seguintes grupos tratados com veículo (v.o, n=10), com HPS nas doses de 30, 100 e 300 mg/Kg (v.o, n=10 cada) e indometacina (v.o, n=10 ). Uma hora após, foram injetados ácido acético (10mg/kg peso) na cavidade intraperitonal dos animais e estes foram colocados em cilindro de vidro e a intensidade do efeito nociceptivo foi quantificada através da contagem do número total de contorções abdominais ocorrendo entre 0 e 20 min após a aplicação (LAPA et al., 2008).

Teste de Edema de Pata: Foram utilizados camundongos fêmeas tratados com indometacina 10mg/Kg (v.o, n=6), veículo 10mg/Kg (v.o, n=6) e HPS nas doses de 30, 100 e 300mg/Kg (v.o, n = 6 cada). Uma hora após foi induzido o edema pela injeção de carragenina 20 µL (1000 µg/pata) na região plantar da pata posterior direita. Antes e após uma, duas, três e quatro horas da administração da carragenina foram feitas medidas do edema com uso do pletismômetro (CARVALHO et al.1999).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição centesimal do soro encontra-se na Tabela 1, onde se observa o elevado teor de proteínas, aproximadamente 84%. O hidrolisado com alcalase apresentou a mesma o mesmo teor de proteínas, indicando que não houve alteração da composição após a hidrólise.

**TABELA 1** – Composição centesimal do concentrado de soro de leite.

Composição (% em base seca)	Concentrado de Soro de Leite
Proteína (Nx6,38)	83,86 ± 0,51
Lipídeos	6,33 ± 0,14
Cinzas	3,08 ± 0,09
Lactose	6,73 ± 0,11

### Teste do Micronúcleo

O teste teve a duração de 15 dias, sendo que os animais foram pesados diariamente e o consumo de ração controlado. As frequências de micronúcleos (MNs) em eritrócitos policromáticos (MNPCEs) de medula óssea de camundongos, após a administração das dietas experimentais, são apresentadas na Tabela 2.

**TABELA 2:** Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCEs) de medula óssea de camundongos Swiss dos grupos experimentais.

Grupos/ Tratamentos	Total de células analisadas	Número de PCEs analisados	Número de NCEs analisados	Número de MNPCEs analisados
G1/CAS12+CPA	7000	1933	5067	158
G2/CAS12+NaCl	6000	2388	3612	62
G3/HPS12+CPA	8000	4048	3952	223
G4/HPS12+NaCl	8000	3596	4404	62
G5/CPS12+CPA	6000	2306	3694	157
G6/CPS12+NaCl	5000	2174	2826	39

CAS12: dieta com 12% de caseína; HPS12: dieta com 12% de hidrolisado de soro do leite; CPS12: dieta contendo 12% de concentrado protéico do soro de leite.

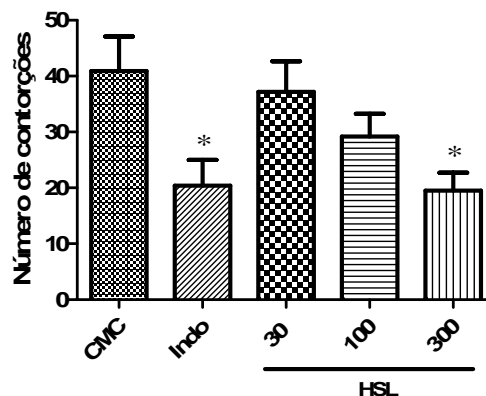
Os resultados demonstram que as dietas avaliadas não apresentaram efeito

mutagênico, uma vez que o número de MNPCs do grupo tratado com HPS + NaCl 0,9% foi estatisticamente menor do que o controle positivo que recebeu caseína. Portanto, as dietas não apresentaram efeito antimutagênico, devido ao fato do número de MNPCs do grupo tratado com HPS + CPA é maior do que o grupo tratado com caseína (controle positivo).

Efeitos protetores dessa mesma dieta não foram observados, pois o número de MNPCs dos grupos tratados com HPS + NaCl e CPS + NaCl foram estatisticamente iguais com o grupo tratado com caseína + NaCl (controle negativo).

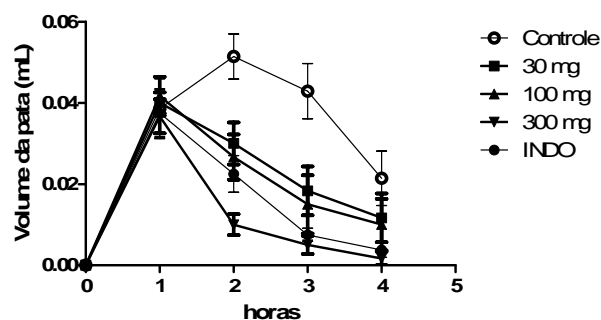
#### Teste de Contorções Abdominais

A Figura 2 mostra que o HPS reduziu de forma significativa ( $p < 0,05$ ) o número de contorções entre o grupo controle ( $40,90 \pm 6,19$ ) e na dose de 300mg/kg ( $19,20 \pm 3,21$ ), onde este valor não difere do obtido com o tratamento de indometacina.



**FIGURA 2.** Número de contorções abdominais observadas após uma hora da injeção do ácido acético na cavidade intraperitoneal durante 20 minutos. \* $p < 0,05$ .

Teste de Edema de Pata: A Figura 3 mostra que o HPS reduziu de forma significativa ( $p < 0,05$ ) o edema para doses entre 30mg/kg ( $0,03 \pm 0,005$ ), 100mg/kg ( $0,027 \pm 0,006$ ), 300mg/kg ( $0,01 \pm 0,003$ ) e indometacina ( $0,022 \pm 0,005$ ), quando comparados ao valores do controle ( $0,051 \pm 0,006$ ).



**FIGURA 3.** Edema de pata após uma, duas, três e quatro horas da administração da carragenina.

## CONCLUSÕES

A análise da matéria prima revelou um elevado teor de proteínas, aproximadamente 84%, sendo este valor preservado para o hidrolisado com alcalase nas condições utilizadas.

A concentração de 12% de proteína nas dietas (caseína, HPS e CPS) elaboradas para o tratamento dos animais não apresentaram caráter mutagênico, antimutagênico e nem protetor. Contudo as dietas não trazem nenhum tipo de malefício e nem benefício para os animais, neste aspecto.

O hidrolisado do soro de leite apresentou efeito antiinflamatório e antinociceptivo, observado nos testes de edema de pata e contorção abdominal, respectivamente, semelhante ao registrado para a indometacina (controle positivo).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.A.C. HORWITZ, W. (Ed.) **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 18th ed., Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2005.

CARVALHO, J. C. T. *et al.* Antiinflammatory activity of de crude extract from the fruits of pterodon emarginatus vog. *Journal Ethnopharmacology*, v. 64, p.127-133, 1999.

GONZÁLES-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PÁEZ, M.P.; GUADIX, E.M. Enzymatic hydrolysis of whey proteins: I. Kinetic models. **Biotechnology and Bioengineering**, v.44, p.523-528, 1994.

LAPA, A.J.; SOUCCAR C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; CASTRO, M.S.A.; DE LIMA, T.C.M. **Plantas Medicinais: Métodos de avaliação da atividade farmacológica**. Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais, 2008.

HOSSEINI, M., SHOJAOSADATI, S. A., AND TOWFIGHI, J. Application of a bubble-column reactor for the production of a single-cell protein from cheese whey. *ind. Eng. Chem. Res.*, v.42, pp. 764-766, 2003.

SGARBIERI, V.C.; PACHECO, M.T.B. Revisão Alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, 2(1.2): 7-19, 1999.

TORRES, D.P.M.; Geleificação térmica de hidrolisados enzimáticos de proteínas do soro de leite bovino. **Tese de Mestrado pela Universidade do Minho**. Braga, 2005.

WHITTLE, B.A. The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and nonnarcotic analgesics. **British Journal of Pharmacology** , v.22, p.246-253, 1964.

WINTER, C.A., RISLEY, E.A., NUSS, G.W. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rats as an assay of anti-inflammatory drugs. In: **Proceedings of Society of Experimental Biology and Medicine**. v.3, p.544-7, 1962.